444.
3. Куклина Е.М., Ширшев С.В, Шарова Н.И., Ярилин А.А. Влияние хорионического гонадотропина на дифференцировку тимоцитов в присутствии эпителиальных клеток тимуса // Онтогенез, 2003. Т. 34, № 1. С. 36-42.
4. Bailo M., Soncini M., Vertua E. et. al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta // Transplantation. 2004. V. 78, № 3. P. 1439-1448.
5. Trelford J.D., Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present // Am. J. Obstet. Genicol. 1979. V. 137, № 7. P. 833.
6. Патент № 74976 Украина. Гончарук Е.И., Петренко Т.Ф., Павленко О.В., Парфенова В.В., Грищенко В.И. Препарат для лечения ожогов на основе клеток хориона, способ его приготовления и способ лечения. Опубл. 15.02.2006. Бюл. № 2.
7. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С. и др. Клиническое применение криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Метод. рекомендации. Киев, 1991. 9 с.
8. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. Киев.: «Наукова думка». 1979. 100 с.
9. Spees J., Olson S., Whitney M. et. al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103, № 5. P. 1283-1288.

УДК: 577.3; 57.043

Э.Н. Гахова, Т.Н. Пашовкин, Е.В. Мельникова, В.К. Утешев, Д.Г. Садикова
Институт биофизики клетки РАН

УЛЬТРАЗВУК МОЖЕТ ИЗМЕНЯТЬ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЗАРОДЫШЕВЫХ ОБОЛОЧЕК АМФИБИЙ

Низкая проницаемость зародышевых оболочек гидробионтов для воды и криопротекторов является одной из основных причин отсутствия успехов при криоконсервации зародышей. Зародышевые оболочки можно удалить механическим, микрохирургическим или ферментативным способами. Однако такие способы нарушают целостность зародышей. Это обстоятельство приводит к поиску более щадящих методов обработки зародышей с целью увеличения проницаемости оболочек для воды и криопротекторов. Одним из таких методов может служить воздействие на зародыши высокочастотного ультразвука, который, как известно, вызывает изменение проницаемости биологических мембран для целого ряда веществ (Pasechnik, Sokolov, 1973; Bundy et al., 1978; Rohr and Rooney, 1978; Пашовкин, 1981, 1998; Вишневский, 1990). Мы изучаем возможность изменения проницаемости зародышевых оболочек амфибий под воздействием непрерывного ультразвука при сохранении зародышами способности к развитию (Мельникова и др., 2005; Утешев и др., 2006).

В настоящей работе представлены данные о действии ультразвука на развитие зародышей амфибий (травяная лягушка *Rana temporaria*) и на проницаемость их зародышевых оболочек для флуоресцентных красителей.

Для обработки ультразвуком зародыши на стадии бластулы помещали в специально сконструированную камеру. Источником ультразвука служила установка УЗТ-1.026. Частота ультразвука составляла 0,88 МГц, или 2,64 МГц. Интенсивность ультразвука варьировали от 0,05 Вт/см^2 до1,0 Вт/см^2. Длительность воздействия изменяли в разных сериях эксперимента от 1 до 15 минут.

Состояние зародышей после действия ультразвука оценивали по числу зародышей, выживших до стадии выклева. Об изменении проницаемости зародышевых оболочек после обработки ультразвуком судили по наличию флюоресценции в межклеточном пространстве и/или в клетках зародышей после флуорохромирования в растворах 1-анилино-8-нафталино сульфоната (АНС), флуоресцеиндиацетата (ФДА), или флуоресцеина (Ф). Для визуальной оценки и регистрации использовали модифицированный люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-ИЗ (ЛОМО, Россия). Контролем служили флуорохромированные зародыши амфибий, не подвергавшиеся воздействию ультразвука.

Действие ультразвука на развитие зародышей амфибий. Как можно видеть на рис. 1, в контроле лишь 66% зародышей, отобранных на стадии бластулы, достигали стадии выклева. После воздействия ультразвуком с частотой 0,88 МГц и интенсивностью 0,05 Вт/см^2 число развивающихся до выклева зародышей увеличивалось: пос-

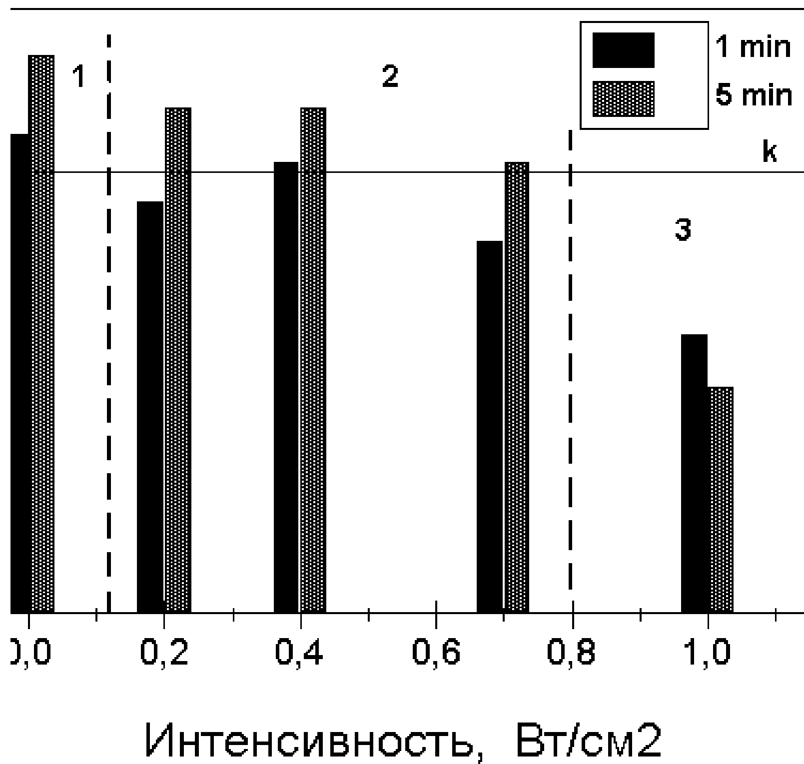


Рисунок 1. Зависимость выживаемости зародышей лягушки Rana temporaria (% развивающихся зародышей) от интенсивности ультразвука. Частота ультразвука f=0.88 МГц

ле обработки в течение 1 минуты - до 72%, а после 5-минутного воздействия – до 84%. После обработки ультразвуком интенсивностью от 0,2 до 0,7 Вт/см^2 число развивающихся зародышей было сопоставимо с контрольным. Увеличение интенсивности ультразвука до 1,0 Вт/см^2 приводило к заметным повреждениям зародышей. После 1 минуты воздействия число развивающихся зародышей снижалось до 40%, а после 5-минутной обработки - до 32%.

Проницаемость оболочек интактных зародышей амфибий. В контрольных экспериментах нами показано, что желточная оболочка амфибий в норме практически непроницаема не только для таких медленно проникающих в неповрежденные клетки флуоресцентных красителей, как АНС (Утешев и др., 2002), но и для ФДА, который проходит через неповрежденные мембраны соматических и зародышевых клеток млекопитающих и амфибий (Мельникова и др., 1984, 1999, 2004). Оболочки зародышей амфибий оказались непроницаемы и для флуоресцеина. Об этом свидетельствовало отсутствие свечения как в межклеточном пространстве, так и в клетках интактных зародышей, несмотря на продолжительное время выдерживания зародышей в растворах красителей (60-90 мин).

Изменение проницаемости зародышевых оболочек под действием ультразвука. В этом разделе работы выполнены 2 серии экспериментов.

В 1-ой серии зародыши подвергали воздействию ультразвука с частотой 0,88 МГц, различной интенсивности (от 0,2 Вт/см^2 до 1,0 Вт/см^2) и разной длительности обработки (1-15 мин), затем выдерживали в растворах флуорохромов ФДА или АНС (5-20 мин.), и анализировали при помощи люминесцентного микроскопа. По полученным результатам эти эксперименты можно объединить в 3 группы.

В первую группу включены эксперименты, в которых после воздействия ультразвука не было обнаружено изменений проницаемости желточной оболочки зародышей к ФДА и АНС. В этих опытах, как и в контроле, флуоресцентные красители не были обнаружены ни в клетках зародышей, ни в межклеточном пространстве. Такие зародыши продолжали нормально развиваться при их дальнейшем культивировании. В этих случаях обычно использо-

вали ультразвук малой или средней интенсивности, от 0,05 Вт/см^2 до 0,2 Вт/см^2.

Во вторую группу отнесены эксперименты, в которых воздействие ультразвука приводило к необратимым повреждениям желточной оболочки зародышей. После окрашивания АНС клетки этих зародышей интенсивно светились. Прохождение АНС в клетки зародышей свидетельствовало о резком увеличении проницаемости желточной оболочки (о нарушении ее барьерной функции) и о существенном повреждении мембран зародышевых клеток. Такие зародыши всегда погибали. Интенсивность ультразвука в этих опытах обычно варьировали в пределах 0,7-1,0 Вт/см^2.

В третью группу мы объединили те опыты, в которых флуорохромирование ФДА обработанных ультразвуком зародышей приводило к свечению значительной части зародышевых клеток. Такое свечение клеток зародышей свидетельствовало о том, что проницаемость желточной оболочки этих зародышей изменилась, увеличилась скорость прохождения через нее флуорохрома, а жизнеспособность самих зародышевых клеток сохранилась прежней. Свечение обработанных ФДА клеток означало, что их клеточные мембраны не повреждены и что внутриклеточные эстеразные системы нормально функционируют. Такие зародыши обычно продолжали нормально развиваться. Как правило, подобная картина наблюдалась в опытах, в которых интенсивность ультразвука колебалась в пределах 0,4-0,7 Вт/см^2.

Во второй серии экспериментов исследовали изменение проницаемости зародышевых оболочек при ультразвуке с частотой 2,64 Мгц, интенсивностью от 0,05 до 1,0 Вт/см^2, при длительности воздействия 1-5 минут. Было обнаружено, что обработка зародышей ультразвуком интенсивностью 0,4-0,7 Вт/см^2 приводила к увеличению проницаемости оболочек к флуоресцеину при сохранении низкой проницаемости к ФДА и АНС. Об этом свидетельствует наличие флуоресценции в зародышах после окрашивания флуоресцеином и отсутствие свечения после обработки ФДА и АНС.

Таким образом, непрерывный ультразвук может вызывать увеличение проницаемости зародышевых оболочек амфибий. Действие ультразвука на проницаемость зародышевых оболочек и на развитие зародышей зависит от его параметров (частоты, интенсивности и длительности воздействия).

Работа выполнена при совместной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности и науки Московской области (гранты № 04-04-97300 и № 04-04-97276).

SUMMARY

It was demonstrated that continuous ultrasound modifies the permeability of embryonic envelope of grass frog Rana temporaria for fluorochromes ANS, FDA and fluorescein. It was found that the ultrasound of 0,88 MGHz and 0,4-0,7 W/cm^2 intensity increased the permeability of embryonic envelope for ANS and FDA, whereas the ultrasound of 2,64 MGHz and the same intensity increased the permeability for fluorescein with retention of the low permeability for FDA. Embryos continued the normal development after treatment with ultrasound under these conditions.